中华蜜蜂细胞色素 CYP9E2 基因克隆及其表达分析

江武军, 何旭江, 王子龙, 颜伟玉, 曾志将, 吴小波*

(江西农业大学蜜蜂研究所, 南昌 330045)

摘要:【目的】克隆中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 细胞色素 CYP9E2 基因的完整编码区序列,分析 CYP9E2 基因在工蜂体内的表达特征,为研究该基因的生物学功能提供理论基础。【方法】以解剖获得的中华蜜蜂采集蜂中肠组织为材料,提取总 RNA。利用 RT-PCR 技术克隆中华蜜蜂 CYP9E2 基因的编码区。采用多种生物信息学软件分析该基因的核苷酸和氨基酸序列,利用荧光定量 PCR 技术(quantitative real-time PCR)分析其在中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段(初生蜂、哺育蜂、守卫蜂以及采集蜂)头部和中肠组织中的相对表达量及在饲喂氟氯苯菊酯后工蜂中肠组织中的表达变化。【结果】克隆获得中华蜜蜂 CYP9E2 基因(命名为 *AcCYP9E2*)mRNA 序列, 长度为 1 600 bp (GenBank 登录号:KX394629),编码区长 1 494 bp,编码 497 个氨基酸,其蛋白质分子量为 57.026 kD,等电点为 8.32。系统发育树显示,中华蜜蜂 *AcCYP9E2* 与西方蜜蜂 *Apis mellifera*、小蜜蜂 *Apis florea* CYP9E2 基因聚成一支。对中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段头部和中肠组织 *AcCYP9E2* 相对表达量测定发现,该基因在中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段的表达量存在一定差异,其中,采集蜂头部和中肠组织中 *AcCYP9E2* 相对表达量均显著高于初生蜂、哺育蜂以及守卫蜂($P<0.05$),而且 4 个阶段工蜂中肠组织中的 *AcCYP9E2* 相对表达量均显著高于其头部($P<0.05$)。饲喂氟氯苯菊酯后,工蜂中肠组织中 *AcCYP9E2* 的相对表达量显著高于对照组($P<0.05$)。【结论】推测 *AcCYP9E2* 可能参与了中华蜜蜂机体外源物质的代谢与解毒过程。

关键词: 中华蜜蜂; 工蜂; 细胞色素 P450; 基因克隆; 基因表达; 解毒酶

中图分类号: Q966 **文献标识码:** A **文章编号:** 0454-6296(2016)10-1050-08

Cloning and expression analysis of cytochrome CYP9E2 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*

JIANG Wu-Jun, HE Xu-Jiang, WANG Zi-Long, YAN Wei-Yu, ZENG Zhi-Jiang, WU Xiao-Bo*

(Honeybee Research Institute, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract:【Aim】The objective of this study is to clone the coding region sequence of cytochrome CYP9E2 gene of the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana*, and to analyze its expression profiles in workers, which will contribute to our understanding on the biological function of this gene.【Methods】Total RNAs were extracted from the dissected midgut tissues of *A. cerana cerana* foragers, and the coding sequence of CYP9E2 gene of *A. cerana cerana* was cloned using RT-PCR. The nucleotide and deduced amino acid sequences of the gene were analyzed using bioinformatics software. The relative expression levels of the gene in heads and midguts of the newly emerged workers, nurses, guarders and foragers were compared via quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The relative expression levels of the gene between workers fed with flumethrin and the ones fed with 30% sucrose (control) were also compared.【Results】

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360587); 国家蜂产业技术体系资助项目(CARS-45-kxj12)

作者简介: 江武军, 男, 1991 年生, 江西吉水人, 硕士研究生, 主要从事蜜蜂生物学研究, E-mail: jiangwj2260@163.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wuxiaobo21@163.com

收稿日期 Received: 2016-08-02; 接受日期 Accepted: 2016-10-08

The full length mRNA sequence of CYP9E2 gene of *A. cerana cerana* (named *AcCYP9E2*) is 1 600 bp (GenBank accession number: KX394629). Its coding region is 1 494 bp, which encodes 497 amino acids. The molecular weight and isoelectric point of the encoded protein are 57.026 kD and 8.32, respectively. The phylogenetic tree analysis showed that *AcCYP9E2* of *A. cerana cerana* was firstly clustered with CYP9E2 genes from *A. mellifera* and *A. florea*. The qRT-PCR results showed that the relative expression level of *AcCYP9E2* was different among the four worker bee groups, while the relative expression levels of *AcCYP9E2* in the heads and midguts of foragers were both significantly higher than those of the newly emerged workers, nurses and guarders ($P < 0.05$). The relative expression level of *AcCYP9E2* was significantly higher in the midgut than that in the head in all the four worker bee groups ($P < 0.05$), and the relative expression level of *AcCYP9E2* in the midgut of the flumethrin-treated groups was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). 【Conclusion】These results suggest that *AcCYP9E2* may be involved in the metabolism process and detoxification of exogenous substances in the body of *A. cerana cerana*.

Key words: *Apis cerana cerana*; worker bee; cytochrome P450; gene cloning; gene expression; detoxification enzyme

蜜蜂是一种高经济效益和生态效益的社会性昆虫，其从事采集活动时需长期暴露在外界环境中，不可避免会吸收一些植物次生物质以及接触一些农药（靳三省和刁青云，2014）。近几十年来，人们大量使用农药来防治农业虫害与疾病，使蜜蜂在采集过程中很容易接触这些农药，导致蜜蜂中毒事件时有发生。亚致死剂量的农药降低了蜜蜂的生存能力，如延迟幼虫发育和成虫羽化或缩短成虫寿命等（Wu *et al.*，2011）。

细胞色素单加氧酶系（cytochrome P450 monooxygenses，P450s）是多功能氧化酶（MFO）的核心酶系，是一类广泛存在于生物有机体内的代谢酶系（Wen *et al.*，2001）。细胞色素 P450 在昆虫的生命活动中起着重要的作用，主要涉及生长、发育、取食、代谢等过程。细胞色素 P450 及其功能的发现促进了该血红蛋白膜结合酶的酶学功能研究（Fujii-Kuriyama and Muramatsu，1982）。至今，已发现的昆虫细胞色素 P450 酶系的功能主要有两类：一是催化内源性物质的生物合成和降解，如参与信息素合成等，在昆虫生长、发育和生殖过程中起到重要作用（邱星辉和冷欣夫，1999）；二是对外源性物质进行代谢、活化以及解毒，如对杀虫剂和植物次生物质等，使昆虫对杀虫剂产生抗药性，有利于昆虫适应宿主植物（Chen *et al.*，1995）。研究发现，在德国小蠊 *Blattella germanica* 中 CYP9E2 和 CYP9E2P1 基因参与了其体内的生物解毒作用（Wen *et al.*，2001）。蜜蜂与其他昆虫一样，在一定程度上依赖其体内一系列解毒酶来分解环境中的有毒物质，其中最重要的就是细胞色素 P450 酶系（唐晓伟，2011），如 CYP9 能降解人工合成的杀虫剂以及被广泛用来杀螨的拟除虫菊酯类农药（Mao *et al.*，2011），而且一些真菌毒素也能被蜜蜂体内的细胞色素 P450 酶所降解（Niu *et al.*，2011）。

中华蜜蜂是我国的本地蜂种，对我国植物授粉、养蜂生产、保护物种多样性起着重要作用。目前，中蜂的分布区域和种群数量均比上个世纪要少，植物授粉总量减少直接致使农作物产量降低。其种群数量的减少很有可能与蜜蜂对农药慢性中毒等有关（Kevan，1999）。蜜蜂体内也有一系列的解毒基因，如 CYP9 家族基因（Claudianos *et al.*，2006；Consortium *et al.*，2006）。有研究表明，西方蜜蜂 CYP9E2 基因参与了外源物质代谢解毒过程（Grosso *et al.*，2016）。中华蜜蜂擅长采集零星蜜源，有时外出采集易采到有毒蜜源，即除了农药中毒外，还有有毒蜜源植物导致蜜蜂中毒时有发生，但我们对中华蜜蜂的解毒酶系了解不多。因此，本研究根据西方蜜蜂 CYP9E2 基因序列对中华蜜蜂 CYP9E2 基因进行了克隆，分析该基因的序列信息以及其在中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段头部和中肠组织中的表达情况，为深入研究该基因的生物学功能奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 供试蜜蜂

实验所用中华蜜蜂饲养于江西农业大学蜜蜂研究所。

1.2 主要实验仪器与试剂

Mastercycler Gradient 型 PCR（Eppendorf 公司），7500 Fast 荧光定量 PCR 仪（Applied Biosystems 公司），成像系统（SYNGENE, GENEGenios），DYY-10C 型电泳仪（北京六一科技有限公司）。

TransZol、RNase 抑制剂（Ribonuclease Inhibitor）、pEASY-T3 Clong Vector、Trans1-T1 感受态细胞（均购自北京全式金生物科技有限公司）；dNTP Mixture、反转录酶 M-MLV、LA-Taq 酶、荧光定量 PCR 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ（均购自 TaKaRa 公司）；oligo（dT）（上海英杰合成）；凝胶回收试剂盒 Gel Extraction Kit（北京康为世纪）。

1.3 中华蜜蜂 CYP9E2 基因的克隆及生物信息学分析

1.3.1 样品的采集：在中华蜜蜂蜂群的巢门口用干净的镊子采集后足带有花粉团的采集蜂，并迅速将其装入 RNase-free 的 1.5 mL EP 管中，立即放入液氮，-80℃超低温冰箱保存待提取 RNA。

1.3.2 总 RNA 提取和反转录：在显微镜下解剖采集蜂中肠组织，然后按 TransZol 试剂说明书的操作步骤提取采集蜂中肠组织的总 RNA，5 个采集蜂中肠组织作为一个样本提取 RNA。利用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度，要求其 A_{260} 与 A_{280} 比值在 1.9～2.1 之间。用反转录试剂盒对总 RNA 进行反转录，反应体系为 50 μL：8 μL 总 RNA、3 μL Oligo dT、10 μL MLV buffer、8 μL dNTP Mixture、1.5 μL M-MLV 反转录酶、1.5 μL RNase 抑制剂、18 μL DEPC 水。反转录反应条件：体系混匀后，42℃反应 60 min，70℃温浴 15 min。将得到的第一链 cDNA 置于 -80℃超低温冰箱保存备用，所有步骤均按试剂的使用说明书进行。

1.3.3 基因克隆和测序：根据西方蜜蜂 *CYP9E2* mRNA 序列（GenBank 登录号：XM_006562300.2）及与中华蜜蜂转录组序列比对的结果（Wang *et al*., 2012），利用 Oligo 和 Primer 5.0 软件设计引物，上游引物：5′-TCAAGATAGTCGTGAATAGCCAAC-3′，下游引物：5′-AACTTTGCACGTATGATTTTTCG-3′。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成，用于中华蜜蜂 CYP9E2 基因的 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为 25 μL：2.5 μL 10×LA PCR Buffer、1.5 μL dNTP Mixture、0.5 μL LA-Taq DNA polymerase、上下游引物各 1 μL、5 μL cDNA、13.5 μL 超纯水。PCR 反应条件：94℃预变性 5 min；94℃变性 1 min，55℃退火 1 min，72℃延伸 2 min，30 个循环；72℃终延伸 10 min。PCR 反应结束后，将 1 μL 上样缓冲液和 4 μL PCR 产物混合后，加在制好的 1.25% 琼脂糖凝胶中，在 180 V 电压和 150 mA 电流下，进行电泳 30 min，在凝胶成像系统中观察结果。置于紫外光下用消毒干净刀片切下含目的片段的胶块，采用琼脂糖凝胶回收试剂盒进行回收和纯化 PCR 产物。用 pEASY-T3 Clong Vector 进行连接反应，连接反应体系：胶回收产物 4 μL、pEASY-T3 1 μL，混合后在普通 PCR 仪上 25℃连接 25 min。利用 Trans1-T1 感受态细胞将连接产物进行转化反应。转化后的菌液在含氨苄青霉素的 LB 固体培养基平板上倒置培养 12～14 h。取白色单菌落和蓝色单菌落（作对照）于 5 mL 加有氨苄青霉素的 LB 培养基中培养，37℃ 200 r/min 摇荡培养过夜（10～12 h）。经菌液 PCR 验证后选取 3 个阳性克隆，送到英捷科技公司进行核苷酸序列测定，获得插入片段的准确序列。

1.3.4 生物信息学分析：用 DNAstar 软件中的 Seqman 程序将中华蜜蜂 *CYP9E2* 正反向测序后的序列拼接获得中华蜜蜂 *CYP9E2* 的 cDNA 序列；其氨基酸序列通过 Bioedit 软件按照六读框翻译而成；通过 NCBI 网站上 Blast 进行序列比对分析，利用 ClustalX 的多重序列比较分析与其他物种的同源性；采用 MEGA7.0 软件中邻位相连法（Neighbor-Joining）对已报道物种的 *CYP9E2* 同源基因推导的氨基酸序列构建系统进化树，其系统发生树进行了 3 000 次重抽样构建。

1.4 中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段头部和中肠组织中 CYP9E2 基因表达水平

分别从 3 群中华蜜蜂蜂群中取刚出房幼蜂（初生蜂）、哺育蜂、守卫蜂以及采集蜂（薛菲等，2015），然后用消毒干净的刀片切下其头部组织，解剖其中肠组织，按照 1.3.2 节分别提取总 RNA，每组 5 头蜜蜂的组织为一个样本提取 RNA。引物设计参照从中华蜜蜂中肠组织克隆的 *CYP9E2* mRNA 序列，用 Primer 5.0 软件设计引物序列，并以 *β-actin* 作为内参基因。引物如下：9E2-Forward：5′-CTTTTTGCAGCCGTGAACGA-3′，9E2-Reverse：5′-AATCTGTCGTGCTTCTGGGG-3′；β-actin-Forward：5′-GGCTCCCGAAGAACATCC-3′，β-actin-Reverse：5′-TGCGAAACACCGTCACCC-3′。上述引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。反应体系（10 μL）：cDNA 1 μL、SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ 5 μL、ROX Ⅱ 0.2 μL、上下游引物各 0.4 μL、超纯灭菌水

3 μL，混匀，离心，放入荧光定量 PCR 仪中进行扩增。反应过程条件：50℃ 2 min；95℃ 10 min，95℃ 15 s，58.9℃ 1 min，95℃ 15 s，40 个循环；之后 50℃ 加热到 90℃（每 6 s 升高 1℃），采集荧光生成扩增曲线和熔解曲线。每个生物学样本每个基因设 3 个 PCR 反应。通过荧光定量 PCR 仪直接导出实验结果，得到目的基因与内参基因的 Ct 值。

1.5 中华蜜蜂工蜂氟氯苯菊酯处理后中肠组织 CYP9E2 基因表达水平

分别从 3 群中华蜜蜂蜂群中各取出一张即将出房的工蜂子脾放入控制器中，并置于温度为 35℃、相对湿度为 75% 的恒温恒湿箱中。待工蜂出房后将其放入自制蜂箱（木制长方体，长 20 cm、宽 15 cm、高 10 cm，除上面用塑料纱网外，其他各面均为 1 cm 左右厚度的木板）中，做好标记（周凌云等，2014）。分别饲喂 30% 蔗糖溶液（对照组）、30% 蔗糖溶液配制成的 10 μg/g 氟氯苯菊酯蔗糖混合液（低剂量组）以及用 30% 蔗糖溶液配制成的 100 μg/g 氟氯苯菊酯蔗糖混合液（高剂量组），每组 3 个重复，每天饲喂 3 次，连续饲喂 4 d（Tan *et al.*，2013）。4 d 后取活的工蜂迅速将其装入 RNase-free 的 1.5 mL EP 管中，每管 5 头，立即放入液氮。按 1.4 节进行荧光定量 PCR，分析中华蜜蜂工蜂饲喂不同浓度氟氯苯菊酯后中肠组织 CYP9E2 基因的表达情况。

1.6 数据分析

根据实验所得各样品的目的基因和 *β-actin* 的 Ct 值，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法，以 *β-actin* 为阳性对照，对样品进行校正。利用 StatView 5.01（SAS Institute，Cary，NC，USA）软件中的“ANOVA or ANCOVA”方法进行统计，分析不同样品间的差异显著性（$P < 0.05$，LSD 多重比较）。

2 结果

2.1 中华蜜蜂 CYP9E2 基因克隆及序列分析

2.1.1 序列拼接：中华蜜蜂 CYP9E2 基因克隆完成后进行序列正确性验证，使用 DNAMAN 对正反测序结果中相互重叠的部分进行序列拼接后，将其两端的载体序列去除后获得中华蜜蜂 CYP9E2 基因的有效 mRNA 序列，命名为 *AcCYP9E2*，其长度为 1 600 bp，其编码区序列长为 1 494 bp。将测序结果在 NCBI 上进行同源性检索，结果表明，其与西方蜜蜂 *CYP9E2* 序列最相似，一致性为 92%。该序列已经提交到 GenBank 数据中，获得登录号为 KX394629。

2.1.2 编码蛋白及结构域预测：利用 Bioedit 对 *AcCYP9E2* 基因序列进行六框翻译成氨基酸，推测第 76 – 1 569 个碱基共编码成 497 个氨基酸，与 NCBI 中开放阅读框（ORF）预测的结果一致。通过 SMART（http://smart.embl-heidelberg.de/）数据库分析 *AcCYP9E2* 的氨基酸序列，得到两个结构域，分别是第 5 – 22 位氨基酸处的跨膜区和第 33 – 492 位氨基酸处的 P450 蛋白质家族域（图 1）。

2.1.3 理化性质分析：利用 ProtParam 工具分析预测 AcCYP9E2 蛋白的分子量为 57.026 kD，等电点为 8.32。氨基酸种类及含量见表 1，其中亮氨酸含量最高（11.9%），色氨酸含量最低（1.0%）。在 280 nm 处的消光系数为 0.926，蛋白质的不稳定系数为41.6。

表 1　AcCYP9E2 蛋白的氨基酸种类及含量
Table 1　The variety and content of amino acids of AcCYP9E2 protein

种类 Variety	数目 Amount	含量 Content	种类 Variety	数目 Amount	含量 Content
Ala (A)	23	4.6%	Arg (R)	19	3.8%
Asn (N)	23	4.6%	Asp (D)	24	4.8%
Cys (C)	11	2.2%	Gln (Q)	18	3.6%
Glu (E)	33	6.6%	Gly (G)	29	5.8%
His (H)	11	2.2%	Ile (I)	31	6.2%
Leu (L)	59	11.9%	Lys (K)	42	8.5%
Met (M)	15	3.0%	Phe (F)	35	7.0%
Pro (P)	22	4.4%	Ser (S)	29	5.8%
Thr (T)	23	4.6%	Trp (W)	5	1.0%
Tyr (Y)	17	3.4%	Val (V)	28	5.6%

2.1.4 同源氨基酸序列比对分析：通过 NCBI 数据库和 Clustal X 2.0 软件对 *AcCYP9E2* 编码的氨基酸序列与其他物种的 CYP9E2 同源氨基酸序列进行同源性比对。结果显示，中华蜜蜂 *Apis cerana cerana* 与西方蜜蜂 *Apis mellifera*、小蜜蜂 *Apis florea*、大蜜蜂 *Apis dorsata*、欧洲熊蜂 *Bombus terrestris*、熊蜂 *Bombus impatiens*、麦蜂 *Melipona quadrifasciata*、切叶蜂 *Megachile rotundata*、弓背蚁 *Camponotus floridan*、印度跳蚁 *Harpegnathos saltator*、红火蚁 *Solenopsis invicta* 10 个物种 CYP9E2 基因编码的氨基酸序列一致性分别为 92.14%，91.95%，87.88%，64.73%，61.54%，60.43%，56.24%，50.27%，49.08% 和 46.83%。采用 MAGA 7.0 软件构建进化树，结果表明，中华蜂蜜和西方蜜蜂、小蜜蜂的 CYP9E2 基因聚成一支，该支进一步与大蜜蜂 CYP9E2 基因聚在一起，聚类结果与传统物种分类一致（图 2）。

```
1    ATGGCTTCTGCGTTTTTGACGCTGGTTACGGGTGCGTTATTATTATTGTGCTTCTACCTCTATTTAAAATACACGCATTGGAAGAGAAAT 90
1    M A S A F L T L V T G A L L L L C F Y L Y L K Y T H W K R N 30
91   GGGATTCCGTGCAGTAAAGGATGGTACCCGATAATCGGTCATTTTCTACCCCTGATAACCAAGAAACAAAGTTACAGTGAAGTGATCGAA 180
31   G I P C S K G W Y P I I G H F L P L I T K K Q S Y S E V I E 60
181  CAGCTATATCACGATTATTCGAATCACAGTATGGTTGGAATGTACAAAGGAACGAAACCAGTGTTGGTTCTTCGCGATATCGAGTTGATT 270
61   Q L Y H D Y S N H S M V G M Y K G T K P V L V L R D I E L I 90
271  AAAACCGTGTTGCAAAGTAATTTCTCGAAATTCCACGAAAATGCGGTTAAAATCGATCCAAAATTGGACCCTTTGTTAGCGAAAAATCCA 360
91   K T V L Q S N F S K F H E N A V K I D P K L D P L L A K N P 120
361  TTTTTCTGTTACGGAGAATTATGGCAGACAGGGAGGAAACGTTTGACTTATGCGTTTAGCAACGCGAGATTAAAAATCCTTTTTGCAGCC 450
121  F F C Y G E L W Q T G R K R L T Y A F S N A R L K I L F A A 150
451  GTGAACGAAGTGTGTACAAAATTTCAAAACTTTTTGAACAAGCAGCTACAATCGAGTAAAAAATACGAAGTCGAGTTGAAGTCGTTGTTT 540
151  V N E V C T K F Q N F L N K Q L Q S S K K Y E V E L K S L F 180
541  TTAAAATTTACGAGCGAGGTTGTGGCTAATGCAGGCTTGGGAATCGAAGGTTTCTGTTTCGAGGATGACGAAGTAAAATCCATGTTTACT 630
181  L K F T S E V V A N A G L G I E G F C F E D D E V K S M F T 210
631  AATCTCGACAATAACGATTTCTTGGATACGTTTTTAATTGGGATCATCGTGCATTTTCCCTTTCTTACCAAACTATTGAAGATAAAATTC 720
211  N L D N N D F L D T F L I G I I V H F P F L T K L L K I K F 240
721  CTACCCCAGAAGCACGACAGATTCTTCAGGACAGTGGTGAGGAAAAACTTAGAGTTGAGGAGGAGCGATCCGATACCTAGGAACGATTTC 810
241  L P Q K H D R F F R T V V R K N L E L R R S D P I P R N D F 270
811  ATCCAATTAATGATCGACATGGAGCAGACGGGAGAGAAGATCGACGAGGAGAGTGTGGCGGCTCACGCGGTTTCCTTCTATCTCGATGGA 900
271  I Q L M I D M E Q T G E K I D E E S V A A H A V S F Y L D G 300
901  GTCGAAACGTCCAGCGTCACGCTTAATTTCATTGGATGTCAATTGGCCATTCACCAAGACGTGCAAGAAAAGTTGAGAAAGGAAGTGAGA 990
301  V E T S S V T L N F I G C Q L A I H Q D V Q E K L R K E V R 330
991  TCGACGATCGAGAAACACGGAGGCGTGTTAACGTTCGAGGCGATAAAGGACATGACGTACATGAATCAAGTGATCAACGAATCCCAAAGA 1080
331  S T I E K H G G V L T F E A I K D M T Y M N Q V I N E S Q R 360
1081 TGTTTCTCGGCTCTAGGTTTCCTGGGTAAAATATGCACGGACGAGTTCGAGTTGCAAGGCTCGGATGGATTGAATTATCGCGCGAAACCT 1170
361  C F S A L G F L G K I C T D E F E L Q G S D G L N Y R A K P 390
1171 GGCACCGAAATAGTGATACCGATCTGTGGCTTGCACAAAGATCCGAAATACTGGGACAATCCAGAGATATTCGATCCGGAACGATTCAGC 1260
391  G T E I V I P I C G L H K D P K Y W D N P E I F D P E R F S 420
1261 GACGAGAATAAGAAAAATATAGAAAAGATGGCGTTCCTTCCTTTCGGCGAAGGGCCAAGAATTTGCGTAGGAATGAGAATGGCTATGCTG 1350
421  D E N K K N I E K M A F L P F G E G P R I C V G M R M A M L 450
1351 CAGATGAAGAGTTGTTTGGCTACATTGATGAAAGACTACAAACTCGAAGTTTCGCCGAAAATGCAACTACCGTTGAGATTATCGCCGAAT 1440
451  Q M K S C L A T L M K D Y K L E V S P K M Q L P L R L S P N 480
1441 TATTTTCTATCGGCGCCATTAGGTGGTGGTTGGGTACTGATTTCGGAAGCCTGA 1494
481  Y F L S A P L G G G W V L I S E A * 497
```

图 1　中华蜜蜂 *AcCYP9E2* 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

Fig. 1　Nucleotide and deduced amino acid sequences of *AcCYP9E2* from *Apis cerana cerana*

灰色阴影表示的结构域依次为跨膜螺旋区(黑色方框标注),P450 蛋白质家族域;星号表示终止密码子。Protein domain transmembrane helix region is marked by black boxes, P450 pfam is shaded in grey, and the asterisk indicates stop codon.

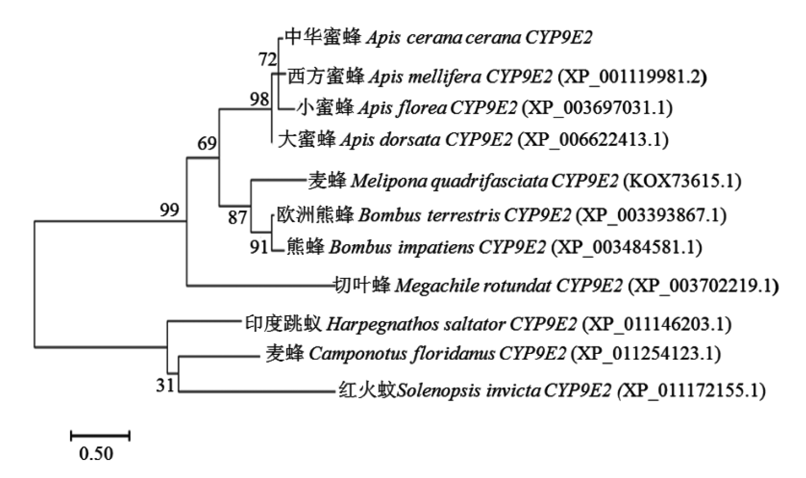


图 2　基于氨基酸序列构建的中华蜜蜂与其他昆虫种 CYP9E2 基因的系统进化树(邻位相连法)

Fig. 2　Phylogenetic tree of CYP9E2 genes from *Apis cerana cerana* and other insect species based on the amino acid sequences (Neighbor-joining method)

系统发育树用邻位相接法进行了 3 000 次重复构建;以 0.50 的遗传距离作为标尺,各节点旁数值表示 CYP9E2 基因在该标度枝进化过程中变化的程度。Phylogenetic tree was constructed by the neighbor-joining method with 3 000 replications; the genetic distance of 0.50 is used as the scale bar. Numbers next to each node indicate the extent to which the CYP9E2 gene changed during the evolution of the scale branch.

2.2 中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段 *AcCYP9E2* 表达分析

结果显示（图 3），中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段之间其头部 *AcCYP9E2* 的相对表达量差异显著（$P<0.05$），其中，采集蜂中的表达量最高，其次为守卫蜂，再次是哺育蜂，表达量最低的为初生蜂；采集蜂中肠组织中 *AcCYP9E2* 的相对表达量显著高于守卫蜂、哺育蜂以及初生蜂，而且守卫蜂和哺育蜂中肠组织中 *AcCYP9E2* 的相对表达量也显著高于初生蜂（$P<0.05$），但守卫蜂与哺育蜂之间差异不显著。另外，采集蜂、守卫蜂、哺育蜂、初生蜂中肠组织 *AcCYP9E2* 的相对表达量均显著高于头部（$P<0.05$）。

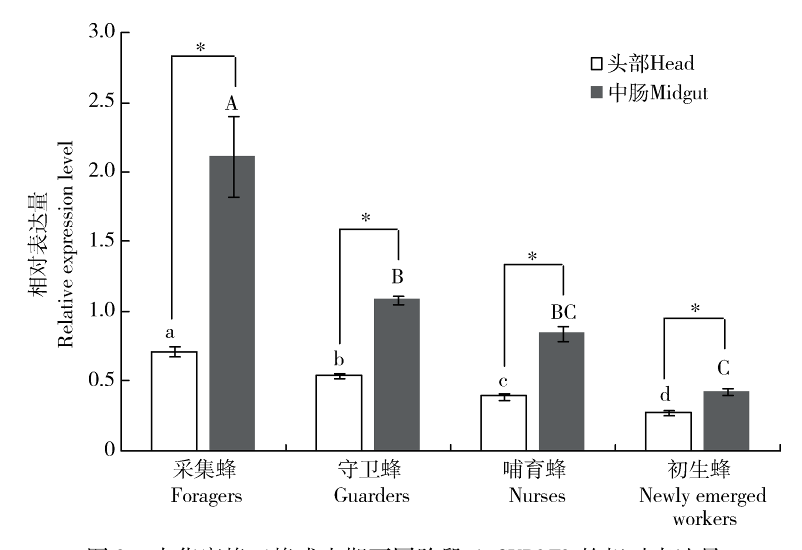


图 3　中华蜜蜂工蜂成虫期不同阶段 *AcCYP9E2* 的相对表达量

Fig. 3　Relative expression levels of *AcCYP9E2* in different developmental stages of worker bees of *Apis cerana cerana*

图中数据为平均值 ± *SE*；柱上不同小写字母表示组间头部 *AcCYP9E2* 基因表达量差异显著（$P<0.05$）（LSD 多重比较）；柱上不同大写字母表示组间中肠 *AcCYP9E2* 基因表达量差异显著（$P<0.05$）；星号表示同一组蜜蜂头部与中肠组织 *AcCYP9E2* 基因表达量差异显著（$P<0.05$）。Data are mean ± *SE*. Different lowercase letters above bars indicate significant difference in the expression level of *AcCYP9E2* in heads among groups（$P<0.05$）（LSD multiple range comparison）, while different capital letters indicate significant difference in the expression level of *AcCYP9E2* in midguts among groups（$P<0.05$）. The asterisk indicates significant difference in the expression level of *AcCYP9E2* between head and midgut within the same group（$P<0.05$）.

2.3 氟氯苯菊酯处理后中华蜜蜂工蜂中肠组织中 *AcCYP9E2* 表达分析

结果如图 4 所示，饲喂氟氯苯菊酯试验组工蜂 *AcCYP9E2* 的相对表达量显著高于对照组，而且，氟氯苯菊酯高剂量组工蜂 *AcCYP9E2* 的相对表达量显著高于低剂量组（$P<0.05$）。各处理组的相对表达量由高到低依次为：高剂量组（0.609 ± 0.024）> 低剂量组（0.526 ± 0.025）> 对照组（0.271 ± 0.012）。

3 讨论

本研究克隆获得了中华蜜蜂 CYP9E2 基因 mRNA 序列，其编码区序列长为 1 494 bp，推导的蛋白质序列含 497 个氨基酸，蛋白分子量为 57.026 kD，等电点为 8.32。氨基酸序列比对分析表明，中华蜜蜂 CYP9E2 基因与西方蜜蜂和小蜜蜂 CYP9E2 基因编码的氨基酸序列相似性较高；CYP9E2 基因系统进化树结果表明，中华蜜蜂与亲缘关系近的西方蜜蜂、小蜜蜂先聚在一起，再与大蜜蜂聚在一起，

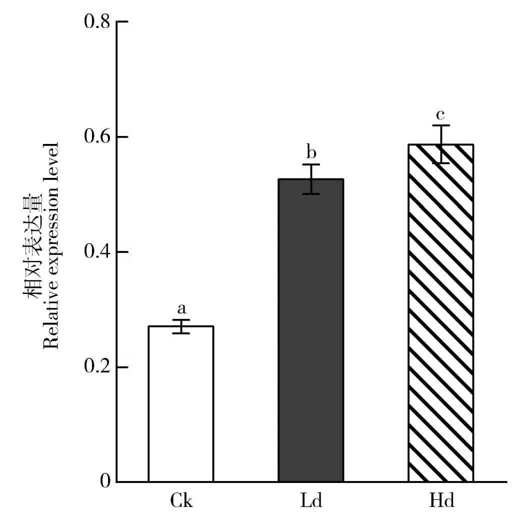


图 4　饲喂氟氯苯菊酯后中华蜜蜂工蜂中肠组织中 *AcCYP9E2* 的相对表达水平

Fig. 4　Relative expression levels of *AcCYP9E2* in midguts of worker bees of *Apis cerana cerana* fed with flumethrin

Ck：对照组（30% 蔗糖溶液）Control（30% sugar）；Hd：高剂量组（100 μg/g 氟氯苯菊酯）High dose group（100 μg/g flumethrin）；Ld：低剂量组（10 μg/g 氟氯苯菊酯）Low dose group（10 μg/g flumethrin）；图中数据为平均值 ± *SE*；柱上不同字母代表组间差异显著（$P<0.05$）（LSD 多重比较）。Data are mean ± *SE*. Different letters above bars indicate significant difference（$P<0.05$）between groups（LSD multiple range comparison）.

聚类结果与物种分类一致。

不同细胞色素 P450 分子具有同源保守区域,其中螺旋 K 区、螺旋 I 区、羧基端血红素结合区以及氨基端的一段疏水区通常被认为是 P450 家族的共同特征(Graham and Peterson, 1999; 邱星辉和冷欣夫, 1999)。血红素结合区是细胞色素 P450 分子中一段高度保守区域,保守的 FxxGxxxCxG 结构成为人们判断细胞色素 P450 的标志(朱昌亮等, 1999)。本研究克隆得到的 *AcCYP9E2* 编码蛋白含有两个结构域,分别为跨膜螺旋区(transmembrane helix region)、P450 蛋白质家族域(P450 pfam),通过 motif 搜索得到一段高度保守的 FxxGxxxCxG 结构(FGEGPRICVG),说明 *AcCYP9E2* 属于细胞色素 P450 基因家族。

细胞色素 P450 酶系对杀虫剂和植物毒素的代谢作用是大多数昆虫产生抗药性和对寄主植物适应性的主要机制(刘秋宁, 2011)。CYP9E2 可以利用 NADH、NADPH 辅酶催化体内毒物的氧化还原反应以达到生物解毒的作用(Brown *et al.*, 2003)。在埃及伊蚊 *Aedes aegypti* 中,CYP9 参与外源物质代谢,转录分析发现,CYP9 基因在不同发育阶段和性别中的表达量存在显著差异,外源物质接触越多,其表达量越高(Poupardin *et al.*, 2010)。而且同一机体不同部位中 CYP9 基因的表达量存在显著差异(唐晓伟, 2011)。本研究表明,中华蜜蜂采集蜂中的 *AcCYP9E2* 的相对表达量最高,其次是守卫蜂,再次为哺育蜂,表达量最低的为初生蜂。主要原因可能是初生蜂没有与外源物质接触,导致初生蜂头部与中肠组织中 *AcCYP9E2* 表达量比较低;而采集蜂需要外出采集,与外源物质接触最为广泛,而且更为直接,使其头部和中肠组织中的 *AcCYP9E2* 表达量最高。守卫蜂与哺育蜂均在巢门口及巢内开展活动,接触的外源物质仅为采集蜂采集回来的花蜜花粉等,其 *AcCYP9E2* 表达量介于采集蜂与初生蜂之间。另外,守卫蜂头部 *AcCYP9E2* 的表达量显著高于哺育蜂的,但守卫蜂中肠组织 *AcCYP9E2* 的表达量与哺育蜂的差异不显著,可能是头部受日龄影响更大,而中肠为消化器官,与外源性物质直接接触,进行消化、吸收以及抵抗等有关。研究还发现,中华蜜蜂工蜂成虫期 4 个不同阶段中肠组织中 *AcCYP9E2* 的表达量均显著高于头部中的表达量,推测 *AcCYP9E2* 可能参与了外源物质代谢。研究结果还发现,饲喂农药氟氯苯菊酯后工蜂中肠组织中 *AcCYP9E2* 表达量显著高于对照组,可能是机体摄入氟氯苯菊酯后需要更多的 *AcCYP9E2* 表达产物来参与该农药的代谢与解毒(Grosso *et al.*, 2016),推测 *AcCYP9E2* 可能是参与蜜蜂体内的生物解毒行为的一个基因。

参考文献 (References)

Brown D, Li Z, Wen Z, Scott JG, 2003. Induction of P450 monooxygenases in the German cockroach, *Blattella germanica* L. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 53(3): 119 –124.

Chen JZ, Michael M, Christopher L, 1995. Downregulation of male-specific cytochrome P450s 2C11 and 3A2 in bile duct-ligated male rats: importance to reduced hepatic content of cytochrome P450 in cholestasis. *Hepatol.*, 22(2): 580 –587.

Claudianos C, Ranson H, Johnson RM, Biswas S, Schuler MA, Berenbaum MR, Feyereisen R, Oakeshott JG, 2006. A deficit of detoxification enzymes: pesticide sensitivity and environmental response in the honeybee. *Insect Mol. Biol.*, 15(5): 615 –636.

Consortium THGS, Weinstock GM, Robinson GE, Gibbs RA, Weinstock GM, 2006. Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature*, 443(7114): 931 –949.

Fujii-Kuriyama Y, Muramatsu M, 1982. Primary structure of a cytochrome P-450: coding nucleotide sequence of phenobarbital-inducible cytochrome P-450 cDNA from rat liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79(9): 2793 –2797.

Graham SE, Peterson JA, 1999. How similar are P450s and what can their differences teach us? *Arch. Biochem. Biophys.*, 369(1): 24 –29.

Grosso CG, Blariza MJ, Mougabure-Cueto G, Picollo MI, García BA, 2016. Identification of three cytochrome P450 genes in the Chagas' disease vector *Triatoma infestans*: expression analysis in deltamethrin susceptible and resistant populations. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*, 44: 459 –470.

Jin SS, Diao QY, 2014. Induced by exogenous substances in the environment of the Italian bee cytochrome p450. *Apiculture of China*, (Z2): 25 –29. [靳三省, 刁青云, 2014. 环境中的外源性物质对意大利蜜蜂细胞色素 p450 的诱导作用. 中国蜂业, (Z2): 25 –29]

Kevan PG, 1999. Pollinators as bioindicators of the state of the environment: species, activity and diversity. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 74(3): 373 –393.

Liu QN, 2011. Cloning and Expression Analysis of Cytochrome P450 CYP4G25 Gene from the Chinese Oak Silkworm, *Antheraea pernyi*. MSc Thesis, Anhui Agricultural University, Hefei. [刘秋宁, 2011. 柞蚕细胞色素 P450 基因 CYP4G25 序列的克隆与表达分析. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文]

Mao W, Schuler MA, Berenbaum MR, 2011. Cyp9q-mediated detoxification of acaricides in the honey bee (*Apis mellifera*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108(31): 12657 –12662.

Niu G, Johnson RM, Berenbaum MR, 2011. Toxicity of mycotoxins to honeybees and its amelioration by propolis. *Apidologie*, 42(1): 79 –87.

Poupardin R, Riaz MA, Vontas J, David JP, Reynaud S, 2010.

Transcription profiling of eleven cytochrome P450s potentially involved in xenobiotic metabolism in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Mol. Biol.*, 19(2): 185 - 193.

Qiu XH, Leng XF, 1999. Expression regulation of cytochrome P450 genes and the molecular basis of P450 monooxygenase-mediated insecticide resistance in insect. *Chinese Journal of Pesticide Science*, (1): 7 - 14. [邱星辉, 冷欣夫, 1999. 昆虫细胞色素 P450 基因的表达与调控及 P450 介导抗性的分子机制. 农药学学报, (1): 7 - 14]

Tan K, Yang S, Wang ZW, Menzel R, 2013. Effect of flumethrin on survival and olfactory learning in honeybees. *PLoS ONE*, 8(6): e66295.

Tang XW, 2011. Preliminary Study on Cytochrome P450 Monooxygenase of *Apis mellifera*. MSc Thesis, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. [唐晓伟, 2011. 西方蜜蜂细胞色素 P450 单加氧酶特性初步研究. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文]

Wang ZL, Liu TT, Huang ZY, Wu XB, Yan WY, Zeng ZJ, 2012. Transcriptome analysis of the Asian honey bee *Apis cerana cerana*. *PLoS ONE*, 7(10): e47954.

Wen Z, Horak CE, Scott JG, 2001. *CYP9E2*, *CYP4C21* and related pseudogenes from German cockroaches, *Blattella germanica*: implications for molecular evolution, expression studies and nomenclature of P450s. *Gene*, 272(1 - 2): 257 - 266.

Wu JY, Anelli CM, Sheppard WS, 2011. Sub-lethal effects of pesticide residues in brood comb on worker honey bee (*Apis mellifera*) development and longevity. *PLoS ONE*, 6(2): e14720.

Xue F, Wu PJ, Li YS, Wang XH, Guo ZB, Xu SF, Wu J, 2015. Sequence analysis and mRNA expression of mab-21 gene in the Chinese honeybee, *Apis cerana cerana* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Entomologica Sinica*, 58(10): 1072 - 1080. [薛菲, 吴鹏杰, 李雨时, 王秀红, 国占宝, 徐书法, 吴杰, 2015. 中华蜜蜂 *mab*-21 基因序列分析及表达特征. 昆虫学报, 58(10): 1072 - 1080]

Zhou LY, Zhang L, Wei YY, 2014. Study of toxicity and safety evaluation oil four pyrethroid insecticides to honeybee (*Apis mellifera* L.). *Resource Development & Market*, 30(6): 641 - 643. [周凌云, 张莉, 魏芸芸, 2014. 4 种拟除虫菊酯类杀虫剂对蜜蜂的毒性和安全性评价. 资源开发与市场, 30(6): 641 - 643]

Zhu CL, Wu GL, Zhang ZS, 1999. Research progress of insect cytochrome P450 in molecular biology. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 17(1): 46 - 50. [朱昌亮, 吴观陵, 张兆松, 1999. 昆虫细胞色素 P450 分子生物学研究进展. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 17(1): 46 - 50]

(责任编辑: 袁德成)